脱色希瓦氏菌（*Shewanella decolorationis*）S12^T 的脱色特性*

许玫英[1,2,3,4] 钟小燕[1,2] 曹 渭[1,2] 郭 俊[1,2] 岑英华[1,2] 孙国萍[1,2]**

（广东省微生物研究所 广州 510070）[1] （广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070）[2]
（中国科学院华南植物园 广州 510650）[3] （中国科学院研究生院 北京 100039）[4]

摘要：从印染废水活性污泥中分离到一株高效染料脱色菌，经鉴定该菌株为希瓦氏菌属的一个新种，命名为脱色希瓦氏菌（*Shewanella decolorationis*）S12^T。该菌株在偶氮染料浓度为50mg/L 的培养基中培养 4h 后，染料去除率达到 96%，对偶氮染料的最高脱色浓度达到2,000mg/L。在浓度为 500mg/L 的偶氮染料平板上生长 4d 后，可观察到明显的脱色圈。全波长光谱扫描的结果表明希瓦氏菌 S12^T 以生物降解的方式对偶氮染料进行脱色。希瓦氏菌 S12T 的脱色酶为组成型的胞内酶。

关键词：脱色希瓦氏菌 S12^T，偶氮染料，脱色

中图分类号：Q93 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2654（2005）01-0005-05

The Decolorizing Characterization of *Shewanella decolorationis* S12^T*

XU Mei-Ying[1,2,3,4] ZHONG Xiao-Yan[1,2] CAO Wei[1,2] GUO Jun[1,2]
CEN Ying-Hua[1,2] SUN Guo-Ping[1,2]**

(*Guangdong Institute of Microbiology*, *Guangzhou* 510070)[1]
(*Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Colletion and Application*, *Guangzhou* 510070)[2]
(*South China Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, *Guangzhou* 510650)[3]
(*Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100039)[4]

Abstract: High efficient dyes decolorizing bacterium, strain S12^T, was isolated from activated-sludge of textile-printing wastewater treatment plant. The strain was identified as a novel specie of the genus *Shewanella*, for which the name *Shewanella decolorationis* sp. nov. is proposed. It's decolorizing rate reached 96% in 4h, when 50mg/L of azo dye was used. The organism exhibited a remarkable color removal capability, even at azo dye's concentration of 2,000mg/L. A clear decolorizing zone around each colonies appeared after four days grown on LB plate containing 500mg/L azo dye. The changes of UV-visible spectra of azo dye solution indicate that the color removal was largely attributed to biodegradation. The decolorizing enzymes of strain S12^T were constitute type and not secreted to the culture medium.

Key words: *Shewanella decolorationis* S12^T, Azo dye, Decolorization

偶氮染料是目前印染行业中应用最广的一类染料。由于这类染料的前体及其在厌氧条件下的降解产物芳香胺类物质具有致癌性，因此有关偶氮类染料的生物降解越来越受到关注。近年来，人们已发现多种对偶氮染料具有高效脱色能力的菌株，包括气单胞菌属、光合细菌、芽胞杆菌属和大肠杆菌[1]等。本实验室从广州某印染厂废水处

---

* 国家“863”高技术研究发展计划项目（No. 2001AA214111）
广东省自然科学基金团队项目资助（No. 015017）

** 联系人 Tel：86-20-87782471，Fax：86-20-87601587，E-mail：gpsun@gis.sti.gd.cn

收稿日期：2004-02-25，**修回日期**：2004-08-23

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

理系统的活性污泥中分离纯化到一株染料脱色菌 S12，该菌株能很好地对偶氮染料酸性大红 GR 和蒽醌染料活性艳蓝进行脱色。经 BIOLOG 细菌自动鉴定系统、16S rDNA 和 *gyr*B 基因序列同源性分析，结果表明，菌株 S12 归属于希瓦氏菌属，是该属的一个新种，已命名为脱色希瓦氏菌（*Shewanella decolorationis*）S12^{T}[2]。希瓦氏菌属是1985年 Macdonell 和 Colwell 根据5S rRNA 序列从交替单胞菌属中另立的新属，目前国际上对希瓦氏菌的研究主要是集中在其降解卤代有机化合物和还原铁、锰、铀等金属方面的能力[3]，对于这类菌属在染料脱色方面的特性研究则较少报道。本文对脱色希瓦氏菌 S12^{T} 对偶氮染料酸性大红 GR（C. I. 27290）的脱色特性进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 染料培养基及菌种

从广州某印染厂废水处理系统的活性污泥中分离纯化的脱色希瓦氏菌 S12^{T}，其分离纯化方法及染料培养基见文献[4]。

1.2 染料脱色率的测定及脱色圈的检测

以10%的接种量，将在 LB 培养液中培养过夜的菌液接种于酸性大红 GR 染料培养基中，30℃静置培养，每隔一段时间取出培养液于6,000r/min 离心去菌体，于酸性大红最大吸收峰处测定吸光值，并以不加菌的染料培养基为对照，计算脱色率。取1mL 经系列稀释的菌液接种至染料浓度为500mg/L 的 LB 固体培养基中，30℃恒温培养，观察脱色情况。研究温度对染料脱色的影响则分别在4℃，10℃，20℃，25℃，30℃，37℃的培养温度条件下进行脱色试验。用 NaOH 和 HCl 调节染料培养基的 pH 为4～11，在不影响染料的吸收光谱的条件下，比较菌株在不同 pH 环境下的脱色率。

1.3 染料生物降解分析

将 LB 活化过夜的菌液接种至偶氮染料浓度为50mg/L 的染料培养液中，于30℃恒温静置培养。采用 UV-600 紫外分光光度计，在波长为200～800nm 处测定不同取样时间培养上清液的吸收光谱曲线。

1.4 染料诱导对脱色活性的影响

按相同的接种量，将菌液同时接种至含染料的和不含染料的 LB 培养液中，30℃静置培养，待染料培养液完全脱色后，将两组培养液分别离心收集菌体，用0.066mol/L 的磷酸盐缓冲液（pH8.0）洗菌体3次，同时加入含相同浓度的染料培养基，30℃静置培养，比较两者的脱色速度。

1.5 脱色酶位置确定

将 LB 培养基活化过夜的发酵菌液20mL 于10,000×g 离心30min，分别收集上清和菌体。用上述磷酸盐缓冲液洗菌体3次，重悬于20mL 磷酸盐缓冲液中，于4℃超声波破碎细胞，制备细胞抽提液。用 Bradford 蛋白质定量测定法，以0.5mg/mL 的牛血清白蛋白（BSA）为标准，分别测定上清和细胞抽提液的蛋白浓度。向染料培养基中分别加入上清和细胞抽提液，使反应体系中的蛋白浓度一致，同时添加 NADH 和 FMN 使其终浓度分别为0.125mmol/L 和50μmol/L。以接种的染料培养液为阳性对照，不接种的染料培养液为阴性对照，比较各样品的脱色速率。上述细胞抽提液制备过程和脱色反应过程分别在好氧和厌氧两种条件下进行。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2 结果与讨论

2.1 脱色希瓦氏菌 S12^T 对偶氮类染料的脱色特性

将菌株接种至液体染料培养基，于 30℃ 恒温静置培养一段时间后，培养液从底部逐步向上出现脱色现象，最后培养液中的红色完全消失。在酸性大红 GR 浓度为 50mg/L 的液体培养基中，培养 80min 后，染料的脱色率达到 42.5%，4h 后，脱色率达到 96% 以上（图 1）。在摇床培养条件下，菌株仅有较低的脱色活性。

当菌株穿刺接种至固体染料培养基时，培养 12h 后，在培养基下方约 1cm 处首先出现脱色，该区域逐步向下扩展，最后使染料完全脱色。将过夜培养的菌液稀释涂布至含有浓度为 500mg/L 酸性大红 GR 的 LB 平板上，经 30℃ 恒温培养 4d 后，可观察到明显的脱色圈形成（图 2）。

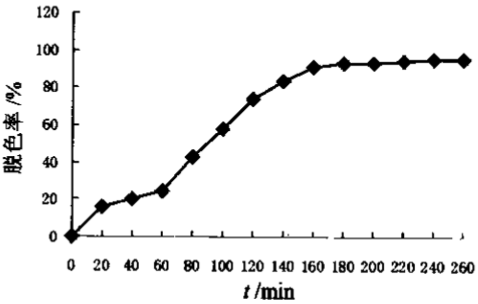

图 1 菌株 S12^T 对酸性大红的脱色速率

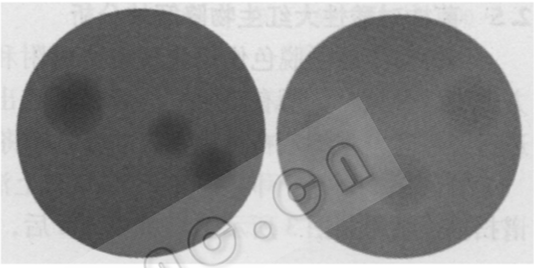

图 2 菌株 S12^T 的脱色圈效果

由此可见，氧分压是影响脱色希瓦氏菌 S12^T 对酸性大红 GR 脱色效果的重要因素。在缺氧条件下，菌株 S12^T 对染料具有较好的脱色效果，这一特性与目前国内外已报道的大多数偶氮类染料脱色菌相类似。大量的研究表明，细菌细胞膜对于强极性的偶氮类染料化合物的渗透性相当低[5]，这也是大部分偶氮类染料脱色菌在完整细胞的条件下脱色率往往较低的主要原因。而脱色希瓦氏菌 S12^T 对偶氮类染料酸性大红 GR 的脱色似乎并不受细胞膜这一屏障的影响，无论是在液体染料培养基还是固体染料培养基中均表现出高的脱色效率。

2.2 染料的浓度对菌株脱色的影响

将菌株 S12^T 接种至含不同浓度的染料培养基中，观察菌株对染料的脱色情况，结果如表 1 所示。当酸性大红 GR 的浓度由 50 mg/L 提高到 2,000mg/L。菌株对染料的脱色率由 96% 降低为 28%。但脱色时间由 4h 增至 240h。可见，随着染料浓度的提高，菌株的脱色能力将会逐渐受到抑制。有关高浓度染料对菌株的抑制作用机理仍有待进一步研究。

表 1 菌株 S12^T 对不同浓度染料的脱色能力

项目	偶氮染料（酸性大红 GR）			
浓度（mg/L）	50	500	1000	2000
脱色时间（h）	4	96	168	240
去除率（%）	96	85	40	28

2.3 温度对染料脱色的影响

在不同培养温度条件下比较菌株的染料脱色速度。当温度由 4℃ 上升至 37℃ 时，菌株对酸性大红的脱色速率基本上呈上升趋势。在 4℃ 条件下，反应 3h 后，脱色率达到 21.3%，6h 后达到 51.4%。在 20℃ ~37℃ 的温度范围内，反应 2h 后，脱色率达到

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

82.6%～91.5%。30℃和37℃温度条件下，在反应开始的1h内，37℃表现出较快的脱色速率，反应2h后，两种条件下的酸性大红脱色率同时达到91%以上。

2.4 pH对染料脱色的影响

在pH为4～11的条件下比较菌株的染料脱色速度，结果发现，当反应起始pH为4和11时，菌株的脱色率始终为0。当反应起始pH为7时，菌株首先以最快的速率对染料进行脱色，0.5h时的脱色率为61.5%，pH8的脱色速率稍慢于pH7，30min时的脱色率为43.5%。反应1h后，pH6～9的脱色率达到73.2%～89.7%，其中，pH7仍保持最高的脱色率。pH5的条件下，菌株的脱色活性受到较大的抑制，对酸性大红的脱色作用较弱，反应2h后的脱色率为22.4%，4h后为31.0%。但无论是起始pH为5还是10，随着脱色反应的进行，试验系统的pH均逐步趋向中性，使脱色反应得以顺利进行。

2.5 菌株对酸性大红生物降解的分析

细菌对染料的脱色作用包括生物吸附和生物降解两种方式。当细菌以生物吸附的方式进行脱色时，所有吸收峰的吸光值将出现等比例的下降；当采用生物降解的方式进行脱色时，上清液在可见光区的吸收峰将完全消失，或者出现新的吸收峰[6]。

对菌株S12^{T}在不同时间的染料培养上清液于200～800nm处进行紫外-可见吸收光谱扫描，结果如图3所示。培养30min后，上清液在紫外-可见光区所有吸收峰的吸光值均较0 h时出现不同比例的下降，在酸性大红GR最大吸收波长503nm处吸光值的下降最快，仅为0 h的41.96%。当培养至1h，上清液在503nm处的吸光值降为0 h的10.50%，紫外光区的吸收峰也有所下降，但其变化速度较为缓慢。当继续培养至2h，上清液在503nm处的吸收值仅为0 h的3.18%。完全脱色后，上清液在可见光区（400～800 nm）没有吸收。随着培养时间的延长，上清液在紫外光区的吸收峰也明显下降。由此可见，菌株S12^{T}是以生物降解的方式对偶氮染料酸性大红GR进行脱色。

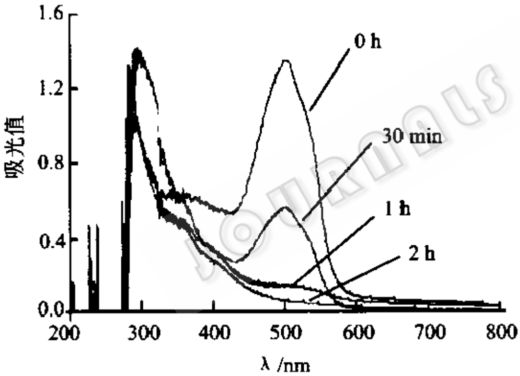

图3 菌株S12^{T}酸性大红脱色产物的全光谱扫描图

2.6 脱色酶组成型的证实

用经含染料或不含染料的LB预培的菌体作接种源，接到新的含染料的脱色试验培养液中，定时取样测定脱色效果。结果如图4所示，无论是否经染料诱导，菌株的脱色速率基本一致。这说明希瓦氏菌S12^{T}所含的脱色酶是属于组成型表达，该酶不需通过与底物接触而诱导产生。Russ所报道的具有偶氮还原酶活性的黄素还原酶（Flavin reductase）[7]和*Candida zeylanoides*的偶氮还原酶也是属于组成型[8]表达。

2.7 脱色酶的位置确定

分别在好氧和厌氧条件下比较发酵上清液和细胞抽提液的脱色速率，结果发现，在厌氧条件下提取和进行脱色反应的细胞抽提液能使偶氮染料酸性大红GR脱色，在好氧条件下提取的细胞抽提液则不具有脱色能力；无论是在厌氧条件下还是好氧条件下

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

发酵上清液均不具有脱色能力。在厌氧条件下，反应 60min 后，细胞抽提液的脱色率达到 23.8%，110min 后，脱色率持续上升至 54.0%，而上清液的脱色率则始终为 0（图 5）。这表明菌株 $S12^T$ 的脱色酶对氧非常敏感，该酶无法分泌到细胞外，属于胞内酶。有关脱色希瓦氏菌 S12 脱色酶的定位及其脱色机理有待进一步的研究。

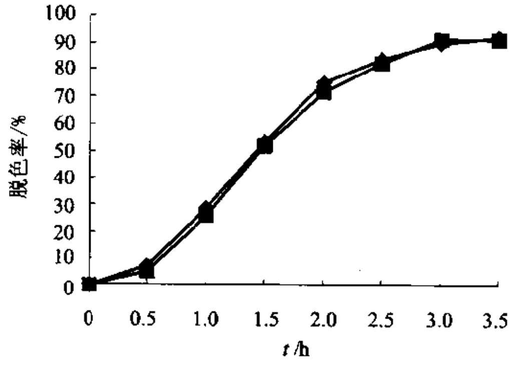

图 4　染料诱导对菌株 $S12^T$ 酸性大红脱色效果的影响

—◆— 未诱导，—■— 已诱导

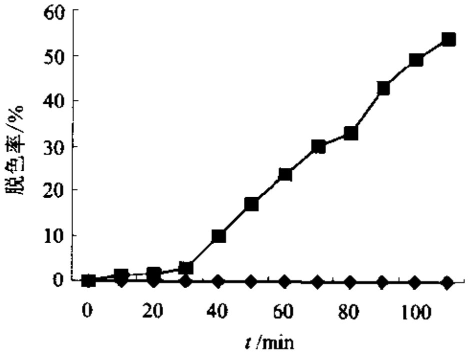

图 5　发酵上清液和细胞抽提液对酸性大红的脱色速率

—◆— 发酵上清液，—■— 细胞抽提液

3　结论

脱色希瓦氏菌（*Shewanella decolorationis*）$S12^T$ 的脱色特性与已报道的脱色菌存在许多差异：（1）菌株 $S12^T$ 具有高效的酸性大红 GR 脱色效果。在染料浓度为 50mg/L 的条件下，反应 4h 后，脱色率达到 96% 以上，对染料的最高脱色浓度可高达 2,000mg/L（相当于 52,400 倍色度）。（2）在通常好氧培养条件下，菌株能在含酸性大红 500mg/L 的平板上形成明显的脱色圈。（3）菌株脱色的温度范围广。菌株在 4℃ 到 37℃ 这一温度范围内均表现出一定的脱色活性，在 20℃ ~37℃ 的温度范围内，反应 2h 后，脱色率达到 82.6% ~91.5%。（4）菌株脱色的 pH 范围广。无论起始 pH 为 5 还是 10，经反应 4h 后，系统的 pH 均逐步趋向中性。（5）脱色活性并不因用染料诱导而提高。这反映菌株的脱色活性与细胞的基本生活功能密切相关。

菌株所具有的这些特性皆有利于该菌株在复杂多变的印染废水处理系统中发挥作用。

参考文献

[1] 宋文华，胡国臣，颜　慧，等．环境科学进展，1999，**7**（1）：25 ~31.

[2] Meiying X，Jun G，Yinghua C，*et al*. Int J Sys Evol Microbol，Papers in Press published online 17 Sept. 2004．DOI 10.1099/i js. 0.63157-0.

[3] Venkateswaran K，Moser D P，Dollhopf M E，*et al*. Int J Syst Bacteriol，1999，**49**：705 ~724.

[4] 许玫英，郭　俊，简浩然，等．城市环境与城市生态，2003，**16**（4）：71 ~73.

[5] Russ R，Rau J，Stolz A. Appl Environ Microbiol，2000，**66**（4）：1429 ~1434.

[6] Chen，K C，Huang W T，Wu J Y，*et al*. J Ind Microbiol Biotechnol，1999，**23**．686 ~690.

[7] 黄　浩，李冬梅，张秀芳，等．生物物理学报，2003，**19**（1）：105 ~109.

[8] Ramalho P A，Scholze H，Cardoso M H，*et al*. Enzyme and Microbial Technology，2002，**31**：848 ~854.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn